

调查研究

花生油中黄曲霉毒素 B₁ 检测能力验证研究庞世琦¹, 刘青¹, 奚星林¹, 陈文锐¹, 相大鹏¹, 何吉子¹, 郭栋²

(1. 广东检验检疫技术中心, 广东 广州 510623; 2. 国家认证认可监督管理委员会, 北京 100088)

摘要:目的 为了解和评价国内相关实验室在黄曲霉毒素检测领域的整体水平和能力, 了解和掌握实验室间检测存在的差异, 国家认证认可监督管理委员会(CNCA)组织了花生油中黄曲霉毒素 B₁ 检测能力验证。方法 依据 ISO 13528:2005、CNAS—GL02:2006、CNAS—GL03:2006 等规定的程序, 对本次能力验证活动进行了实施和评价。待测样品均匀性测试采用 F 检验和 $S_s \leq 0.3\sigma_p$ 检验法, 稳定性测试采用 t 检验法, 采用 Z 比分数评价各实验室的测试结果。结果 共有 91 家实验室参加本次能力验证, 初次结果不满意的实验室有一次补测机会, 最终有 88 家实验室结果“满意”, 2 家实验室结果“可疑”, 1 家实验室结果“不满意”。结论 绝大多数国内相关实验室黄曲霉毒素检测能力整体水平良好, 符合相关国际能力验证标准的要求。

关键词:能力验证; 黄曲霉毒素 B₁; 花生油; 食品安全; 风险监测

中图分类号: R155.58; TS201.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2013)02-0169-05

Validation of proficiency test of aflatoxin B₁ in peanut oil

Pang Shiqi, Liu Qing, Xi Xinglin, Chen Wenrui, Xiang Dapeng, He Jizi, Guo Dong

(Guangdong Import & Export Technology Center, Guangdong Guangzhou 510623, China)

Abstract: Objective This assessment program was established by Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center (IQTC) to evaluate the detection capability of aflatoxin B₁ in peanut oil approved by Certification and Accreditation Administration of the People's Republic of China (CNCA). **Methods** The assessment was performed according to ISO 13528:2005, CNAS-GL02:2006, CNAS-GL03:2006 and the international harmonized protocol for proficiency testing. The homogeneity of samples was assessed by F-test and $S_s \leq 0.3\sigma_p$, the stability was assessed by t-test. The median was used as assigned value to calculate a z-score which was used as a numerical indicator to show participants' performance in the program. **Results** Laboratories which were identified as “unsatisfactory or questionable” had one chance for a second-round test. Finally, 88 samples were observed as satisfactory, 1 sample as questionable and 2 samples as unsatisfactory. **Conclusion** Most of domestic related laboratory possess good detection capability of aflatoxin and could meet the requirements of international proficiency testing standards.

Key words: Validation of proficiency test; aflatoxin B₁; peanut oil; food safety; risk monitoring

黄曲霉毒素是黄曲霉和寄生曲霉等一类真菌的有毒的代谢产物, 在天然污染的食品中以黄曲霉毒素 B₁ 最为多见, 其毒性和致癌性也最强。1993 年被世界卫生组织 (WHO) 的癌症研究机构划定为 I 类致癌物^[1]。其中花生和玉米污染最严重, 尤其是高温高湿地区的粮油及制品中曲霉毒素 B₁ 含量检出率更高, 因此花生和花生油的质量安全问题备受关注。在我国, 特别是在南方湿热地区, 新榨的花

生油中, 黄曲霉毒素 B₁ 的含量常常偏高^[2]。我国对花生油中黄曲霉毒素 B₁ 的限量标准为 20 μg/kg, 欧盟等地区的限量标准为 5 μg/kg^[3]。

定期参加实验室间比对, 例如实验室能力验证计划, 是实验室为了证实其合格的检测能力必须采取的分析质量保证措施的组成部分^[4-7]。鉴于国际贸易和食品安全的要求, 本次能力验证选用花生油作为考核对象。

收稿日期: 2013-01-30

基金项目: 2012 年国家认证认可监督管理委员会能力验证计划 (CNCA -11 - A12)

作者简介: 庞世琦 女 工程师 研究方向为食品安全与检测

E-mail: psqciq@163.com

通信作者: 刘青 女 高级工程师 研究方向为食品安全与检测

E-mail: gdcicq@163.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 参加验证的实验室

本次能力验证是由国家认证认可监督管理委员会 (CNCA) 组织, 由广东检验检疫技术中心具体协调实施, 组织国内实验室参加花生油中黄曲霉毒

素 B₁ 检测能力验证, 要求国家产品质检中心、直属检验检疫局技术中心和省级(含计划单列市和副省级市)产品质检所(院)都应当参加, 检测结果采用 Z 值评估法进行统计和评价^[6]。本次能力验证共有广东、河北、河南、吉林等 26 个省、直辖市、自治区的 91 家实验室参加。其中出入境系统占 35.2%, 质监系统占 38.5%, 农业部系统、粮食系统、疾控系统等占 8.8%, 外资或企业实验室占 17.6%。

1.1.2 主要仪器与试剂

分析天平、高速均质器、高效液相色谱仪、荧光检测器(激发波长 365 nm、发射波长 435 nm)、漩涡混匀器、C₁₈ 色谱柱(25 cm × 4.6 mm, 5 μm)、黄曲霉毒素免疫亲和柱、光化学衍生装置、免疫亲和净化处理设备。

甲醇(色谱纯)、氯化钠(分析纯)、玻璃纤维滤纸、黄曲霉毒素 B₁ 标准储备液: 3 μg/ml(溶剂为苯: 乙腈 = 98:2)。

1.2 方法

1.2.1 样品制备与均匀性检测

能力验证样品采用天然无黄曲霉毒素污染的花生油作为基质, 以人工添加方式加入黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液, 分别制成两种浓度的样品。在所有样品中, 以随机方式抽取 A、B 两组各 10 个样品用于均匀性检验, 对于抽取的每个样品, 在重复条件下测试 2 次, 测试方法参照 GB/T 18979—2003《食品中黄曲霉毒素的测定 免疫亲和层析净化高效液相色谱法和荧光光度法》^[8], 试样经过甲醇-水提取, 提取液经过滤、稀释后, 滤液经过含有黄曲霉毒素特异抗体的免疫亲和层析净化, 去除杂质后以甲醇洗脱, 洗脱液通过光化学柱后衍生装置后, 用带荧光检测器的液相色谱仪测定黄曲霉毒素 B₁ 的含量。经过多次测定所得的样品中 A 样毒素含量范围为 9.0 ~ 12.4 μg/kg, B 样毒素的含量范围为 19.7 ~ 25.5 μg/kg。

1.2.2 样品稳定性检测

天然污染的黄曲霉毒素在农作物中稳定存在, 能耐受高温影响^[9]。考虑到样品传递在 7 月份, 南方地区气温偏高, 为了确保样品在整个过程中的稳定性, 模拟了样品传递和储存中可能出现的状态。首先将所有稳定性试验样品在常温下(20 ~ 25 °C)

放置 5 天, 然后部分放置于 40 °C 环境下放置 4 天, 其余常温下放置, 稳定性检验跨度 30 天。按照温度变化分别在第 1、11 天, 按照时间变化分别在第 1、5、18、30 天随机抽取 3 份水平样品, 每份样品重复测定 2 次, 检验方法、人员、仪器均与均匀性试验相同。

1.2.3 样品包装与发放

将经均匀性和稳定性检验合格的样品置于特快专递专用纸箱中封装, 以特快专递方式发放至各参加实验室, 每个实验室收到 A、B 样品各一份。

1.2.4 测试要求

本次能力验证计划要求参加实验室按照日常检测程序检测花生油样品中的黄曲霉毒素 B₁ 的含量, 推荐采用 GB/T 18979—2003 方法, 也可选择实验室常用的测试方法。

1.3 统计学分析

依据国际 ISO、IUPAC 等制订的分析实验室能力验证的统一准则^[10-11], 根据收到的检测结果分析, 虽有个别极端值出现, 但整体数据近似于正态分布, 适合使用四分位距和中位值稳健统计技术评价各参加实验室的测试结果。按公式 $Z = (X_a - X) / NIQR$ (其中 X_a : 各实验室测定值; X : 中位值; $NIQR$: 标准四分位距), 由参加实验室的检测结果计算出实验室间 Z 比分数值, 再按 Z 值的大小评价各实验室的技术能力。Z 值的绝对值越小, 表明检测结果偏离程度越低, Z 值的绝对值越大, 表明偏离程度越高。检测结果判定原则: $|Z| \leq 2$ 为满意结果; $2 < |Z| < 3$ 为有问题或可疑结果; $|Z| \geq 3$ 为不满意或离群结果。A、B 两样品均为满意结果时总体结果才为满意结果(结果为不满意的实验室可以有一次补测的机会)。

2 结果

2.1 均匀性测试结果

采用 F 检验和 $S_s \leq 0.3\sigma_p$ 原则对测试结果进行评价^[10], S_s 为样品间不均匀标准偏差, σ_p 为能力评定标准差。若 $F < F_{\alpha(n_1, n_2)}$, $S_s \leq 0.3\sigma_p$, 表明样品间所含黄曲霉毒素的差异无统计学意义。均匀性测试结果见表 1。数据表明, 样品均数差异无统计学意义, 样品是均匀的。

表 1 均匀性测试分析结果

Table 1 Homogeneity testing results

样品	总平均值(μg/kg)	F 值	$F_{\alpha(9,10)}$	$F < F_{0.5(9,10)}$	S_s	σ_p	S_s/σ_p	$S_s/\sigma_p \leq 0.3$
A	11.9	1.44	3.02	满足	0.17	2.62	0.065	满足
B	21.7	1.85	3.02	满足	0.33	4.77	0.069	满足

2.2 稳定性检测结果

稳定性检验的统计方法有 t 检验法, 通常用于

比较一个平均值与标准值/参考值之间或 2 个平均值之间差异是否有统计学意义。本研究采用 GB/T

18979—2003 方法,将不同时间段的稳定性数据进行比较,2 个平均值之间的一致性若 $t <$ 显著性水平 α (通常 $\alpha = 0.05$) 自由度为 $n_1 + n_2 - 2$ 的临界值 $t_{\alpha}(n_1 + n_2 - 2)$,则 2 个平均值之间差异无统计学意义^[12]。该稳定性测试结果见表 2。数据表明样品在整个测试过程中是稳定的,不会影响能力验证结果。

表 2 稳定性测试分析结果

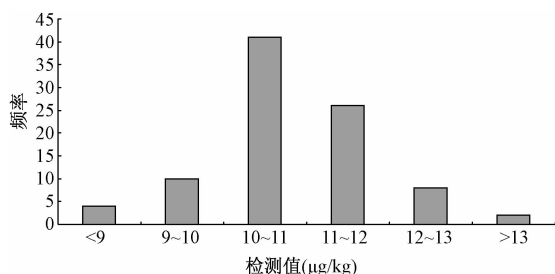
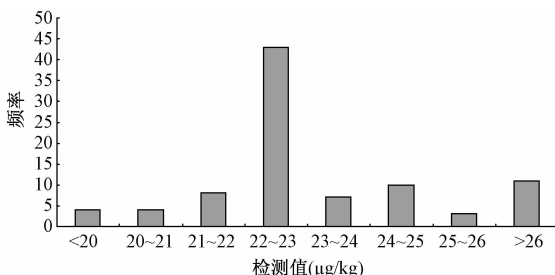
Table 2 Stability testing results

统计值	第 1 天	第 5 天	第 11 天	第 18 天	第 30 天
A 样平均值	12.0	11.6	11.8	11.9	11.6
A 样标准偏差	0.41	0.48	0.29	0.63	0.69
A 样 t 值		1.55	0.98	0.33	1.22
B 样平均值	21.6	21.2	21.5	21.4	21.6
B 样标准偏差	0.83	0.68	0.88	0.77	0.53
B 样 t 值		0.91	0.20	0.43	0

注: A、B 样品自由度均为 10, t 临界值为 2.228, 均满足 $t < t_{\alpha}(n_1 + n_2 - 2)$ 。

2.3 黄曲霉毒素检测能力验证结果

本次能力验证共有 91 家实验室参加, A、B 样品的检测结果频率图分别见图 1、2。A、B 样品中黄曲霉毒素 B₁ 的检测结果均呈单峰分布, 峰形大致对称。基于这种数据分布, 依据国际规定^[11], 适合采用稳健统计方法评价各参加实验室的测试结果。

图 1 各实验室样品 A 的黄曲霉毒素 B₁ 检测值分布图Figure 1 Histogram of sample A's aflatoxin B₁ results in the laboratories图 2 各实验室样品 B 的黄曲霉毒素 B₁ 检测值分布图Figure 2 Histogram of sample B's aflatoxin B₁ results in the laboratories

2.3.1 能力验证标准偏差的确定

能力验证的标准偏差 σ_p 是一个衡量实验室结果偏差的尺度, 可以用 NATA 推荐的标准四分位数间距 (Standard IQR) 计算, 也可以根据 ISO 13528 用稳健标

准偏差 σ_{rob} 计算, 他们的值是随着每一轮次能力验证的变化而改变^[7]。本次能力验证标准偏差的确定, 根据 Horwitz 方程的修正公式计算得到, 即 $\sigma_p = 0.22c$, (适用于待测物浓度低于 120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时), 该方程只取决于被测量的浓度水平。在本次能力验证活动中, A 样 σ_p 为 2.35, B 样 σ_p 为 4.97, 见表 3。

2.3.2 能力验证指定值及其不确定度

正态分布是许多统计处理的基础。对于能力验证结果的数据处理, 一般推荐使用稳健统计技术。目前指定值的计算方法有两种, 一种是 IOS 13528 推荐的算法 A 和算法 S, 该法引自 ISO 5725—5, 即计算参加实验室的 Huber Robust 均数。另一种是采用 NATA 能力验证指南中推荐的中位值和标准化四分位距法^[13]。其实, 当数据分布为单峰和大致对称时, 中位值或 Huber Robust 均数的得数是相近的, 在本次验证中, A 样品黄曲霉毒素 B₁ 的中位值是 10.7, Huber Robust 均数是 10.8, B 样品黄曲霉毒素 B₁ 的中位值是 22.6, Huber Robust 均数是 22.7, 见表 3。

表 3 检测结果稳健统计值汇总表 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Table 3 Summary of statistical analysis of results

统计值	A 样品黄曲霉毒素	B 样品黄曲霉毒素
参加实验室数目	91	91
中位值	10.7	22.6
标准四分位数间距	0.8525	1.464
Huber Robust 均数	10.8	22.7
稳健标准偏差 (σ_{rob})	0.77	0.91
能力验证标准偏差 (σ_p)	2.35	4.97
标准不确定度 (u)	0.10	0.12

通常能力验证指定值的标准不确定度 (u) 依据公式 $u = 1.25\sigma_{rob}/\sqrt{n}$ 计算, 在能力验证中, 对于指定值的标准不确定度, 通常要求 ≤ 0.3 倍能力评定标准差 σ , 即 $u \leq 0.3\sigma$, 如果满足条件, 则在能力评价时可以忽略标准不确定度对计算 Z 比分数的影响^[13]。经计算, A 样品的标准不确定度为 0.10, 低于推荐值 $0.3\sigma_p = 0.71$, B 样品的标准不确定度为 0.12, 低于推荐值 $0.3\sigma_p = 1.49$ 。因此, 在本次能力验证活动中, 指定值的不确定度是可以忽略不记的。

2.3.3 能力验证计划的能力评价

在本次能力验证活动中, 共有 91 个参加实验室报送了结果, 根据参加实验室的检测结果得出的实验室间 Z 比分数值判断。参加实验室的结果评价汇总表 4, Z 值比分数直方图见图 3、4。

表 4 参加实验室黄曲霉毒素测试结果评价

Table 4 Summary of satisfactory results from participants

检测项目	A 样品黄曲霉毒素 B ₁	B 样品黄曲霉毒素 B ₁
中位值 (x , $\mu\text{g}/\text{kg}$)	10.7	22.6
能力验证标准偏差 (σ_p)	2.35	4.97
满意范围 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	9.0 ~ 12.4	19.7 ~ 25.5

本次能力验证的91家实验室中有88家实验室结果“满意”,占96.7%;1家实验室结果“可疑”,占1.1%;2家实验室结果“不满意”,占2.2%。其中有12家实验室通过补测结果“满意”。本次实验室检测能力验证的结果是实验室在相关领域检测能力的客观反映。了解了国内相关实验室在黄曲霉毒素检测领域的整体水平,达到验证和加强相关实验室检测能力、督促其保持和提高食品中黄曲霉毒素检测能力的目的。

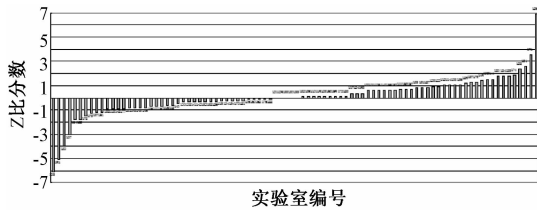


图3 样品A实验室Z值比分数序列图

Figure 3 Z-scores for sample A in proficiency testing

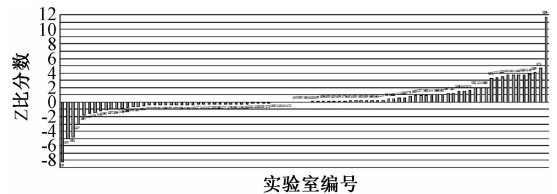


图4 样品B实验室Z值比分数序列图

Figure 4 Z-scores for sample B in proficiency testing

3 讨论

本次能力验证推荐使用GB/T 18979—2003《食品中黄曲霉毒素的测定 免疫亲和层析净化高效液相色谱法和荧光光度法》,但没有强制采用指定方法,实验室可采用日常使用的方法进行检测。从反馈的结果和信息看,参与验证的实验室采用的标准或方法较多,见表5。

表5 不同分析方法统计

Table 5 Statistical analysis of different testing method

测试方法	使用实验室数目	满意实验室数目	满意率%
GB/T 18979—2003:液相质谱	10	9	90
GB/T 18979—2003:液相色谱(柱后衍生)	43	40	93
GB/T5009.23—2006:液相色谱(柱前衍生)	9	3	33
食品中化学污染物及有害因素监测工作手册:液相色谱(柱后衍生)	1	1	100
GB/T 18979—2003:荧光光度计	3	3	100
GB/T5009.22—2003:薄层色谱	1	1	100
实验室内部方法:酶标仪	24	19	79

根据实验结果看,对此次能力验证样品的目标物,各实验室只要严格按照标准中要求的步骤进行实验,并有良好的质量控制手段,测试结果基本达到满意。在黄曲霉毒素检测中,液相色谱法应用最为广泛,根据反馈的原始数据可看出使用光化学或柱后化学衍生比使用柱前化学衍生效果更佳。建议使用免疫亲和层析净化,洗脱液通过光化学柱后衍生装置后,通过液相色谱仪测定黄曲霉毒素 B_1 的含量。

本次参加能力验证的91家实验室中,国家级产品质检中心、直属检验检疫局技术中心和省级(含计划单列市和副省级市)产品质检所(院)50家,其中5家实验室补测结果“满意”,占10.0%,1家实验室结果“不满意”,占2.0%。地级市的实验室31家,其中7家实验室补测结果“满意”,占22.6%,1家实验室结果“不满意”,占3.2%,1家实验室结果“可疑”,占31家实验室的3.2%。数据显示地级市的实验室检测能力有待提高,而省级市的实验室能力就相对较高。除此以外还有10家外企或私人企业的实验室参加,满意率为100%,说明黄曲霉毒素的检测能力已达到一定水平,足以满足国内食品的检测与监控。

参考文献

- [1] International Agency for Research on Cancer (IARC). Heterocyclic aromatic amines[M]//WHO. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, France: IARC, 1993: 165-242.
- [2] 周垂钦,祝清俊,段友臣,等.我国花生油产业发展现状与前景[J].中国油脂,2009,34(10):5-8.
- [3] 陈仪本,蔡斯赞,黄伯爱,等.生物学法降解花生油中黄曲霉毒素的研究[J].卫生研究,1998,(s1):79-84.
- [4] 国际标准化组织及国际电工委员会. ISO/IEC 17043: 2010 Conformity assessment-General requirements for proficiency testing[S]. Geneva: Switzerland, 2010.
- [5] 国际标准化组织及国际电工委员会. ISO/IEC 17025: 2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories[S]. Geneva: Switzerland, 2005.
- [6] 联合国粮食及农业组织. 2003年全世界食品和饲料真菌毒素法规[R]. 罗马:联合国粮食及农业组织, 2004.
- [7] 鲍蕾. 中国出口花生黄曲霉毒素检测能力验证研究[J]. 食品科学, 2009, 30(24): 381-384.
- [8] 全国食品工业标准化技术委员会. GB/T 18979—2003 食品中黄曲霉毒素的测定 免疫亲和层析净化高效液相色谱法和荧光光度法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [9] Chu F S, Chang C C, Samy H. Stability of aflatoxins B_1 and ochratoxin A in brewing[J]. Applied Microbiology, 1975, 19(3): 313-316.